

Nincs bizonyíték a renin–angiotenzin–aldoszteron-rendszer expressziójára otoszklerotikus stapestalpokban

Liktor Balázs dr.¹, Csomor Péter dr.², Szász Csaba Sándor dr.³, Sziklai István dr.², Karosi Tamás dr.¹

¹BORSOD-ABAÚJ-ZEMPLÉN MEGYEI KÓRHÁZ ÉS EGYETEMI OKTATÓKÓRHÁZ, FÜL-ORR-GÉGÉSZETI ÉS FEJ-NYAKSEBÉSZETI OSZTÁLY, MISKOLC

²DE OEC, FÜL-ORR-GÉGÉSZETI ÉS FEJ-NYAKSEBÉSZETI KLINIKA, DEBRECEN

³DE OEC, PATOLÓGIAI INTÉZET, DEBRECEN FÜL-ORR-GÉGÉSZETI ÉS FEJ-NYAKSEBÉSZETI OSZTÁLY, MISKOLC

ÖSSZEFOGLALÁS

Számos újszerű otoszklerózissal foglalkozó tanulmány számol be genetikai összefüggésekről a renin–angiotenzin–aldoszteron-rendszer (RAAS) különböző génjeinek egy pontos nukleotid-polimorfizmusaival (single nucleotide polymorphism, SNP) kapcsolatban anélkül, hogy a RAAS expresszióját humán stapestalpak segítségével igazolnák. Az eddigi eredmények meglehetősen ellentmondásosak, ugyanis a RAAS kifejeződése kizárólagosan idegi-, ér- és vese eredetűnek tulajdonítható. Hematoxilin-eozin (HE.) és RAAS-specifikus immunfluoreszcens (IFA) festéssel analizáltunk ankilotikus stapestalpakot (n=20), kortikális csontfragmentumokat (n=10) és humán vese-szövetmintákat (n=10). Az összes ankilotikus stapestalpak szövettanilag megerősített otoszklerózisnak bizonyult. A szövettanilag aktív (n=13) és inaktív (n=7) otoszklerotikus gócok konzekvensen negatív immunreakciót mutattak reninre, angiotenzin konvertáló enzimre (ACE), angiotenzin-II-re (AT-II) és angiotenzin-II-receptorra (AT-IIIR). A kortikális csontokban tekintélyes mennyiségű RAAS expressziót figyeltünk meg a perivaszkuláris csontvelői progenitor sejtekben. Pozitív kontrollként használt vese-szövetminták intenzív RAAS-specifikus immunreakciót adtak. Jelen vizsgálataink alapján a RAAS négy tanulmányozott tagja nem jár fokozott expresszióval és nem is fejeződik ki fehérje szinten humán otoszklerotikus stapestalpakban. Ez a jelenség független az otoszklerózis szövettani aktivitásától. Jelen körülmények között a RAAS etiológiai szerepe megkérdőjelezhető az otoszklerózis patogenezisében.

KULCSSZAVAK

ANGIOTENZIN, ANGIOTENZIN KONVERTÁLÓ ENZIM, ANGIOTENZIN RECEPTOR, OTOSZKLERÓZIS, RENIN, RENIN-ANGIOTENZIN-ALDOSZTERON-RENDSZER

No evidence for the expression of renin-angiotensin-aldosterone system in otosclerotic stapes footplates

SUMMARY

Recent studies have reported genetic associations between single nucleotide polymorphism (SNP) of several genes of renin-angiotensin-aldosterone (RAA) system and otosclerosis without the histologic confirmation of RAA system expression in human stapes footplates. These results are conflicting because RAA system expression has been attributed to neural, vascular, and renal tissues, exclusively. Ankyotic stapes footplates (n=20), cortical bone fragments (n=10), and human kidney tissue specimens (n=10) were processed to hematoxylin-eosin (HE) staining and RAA system-specific immunofluorescent assay (IFA), respectively. Histologic diagnosis of otosclerosis was established in all ankyotic stapes footplates. Histologically active- (n=13) and inactive (n=7) foci of otosclerosis were consequently characterized by negative immunoreactions for renin, angiotensin converting enzyme (ACE), angiotensin-II (AT-II), and angiotensin-II receptor (AT-IIIR), consequently. In cortical bones, a considerable RAA system expression was observed confirmed in the perivascular bone marrow progenitor cells. Kidney specimens, applied as positive controls, showed intense RAA system-specific immunoreactions. Concerning current observations, the 4 studied members of RAA system that did not display active expression were not expressed at protein level in otosclerotic stapes footplates. This phenomenon was independent from the histologic activity of otosclerosis. Between these conditions, the etiologic role of RAA system is questionable in the pathogenesis of otosclerosis.

KEYWORDS

ANGIOTENSIN, ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME, ANGIOTENSIN RECEPTOR, OTOSCLEROSIS, RENIN, RENIN-ANGIOTENSIN-ALDOSTERONE SYSTEM

Levelezési cím:

Dr. Liktor Balázs

Borsod-Abaúj-Zemplén Megyei Kórház és Egyetemi Oktatókórház, Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Osztály, Miskolc, 3526 Miskolc, Szentpéteri kapu 72-76.

Mobil: +36/20-358-3955

Email: balazsliktor@gmail.com

Az otoszklerózis az emberi otikus kapszula sajátos csontdiszkráziája, amely progresszív vezetékes és/vagy szenzorineurális halláscsökkenéshez vezet fiatal felnőttekben (1, 2). A szövettani diagnózist nélkülöző, klinikai otoszklerózis előfordulási gyakorisága hozzávetőleg 0,3-0,4% a kaukázusi rasszban (1). Ezzel szemben, a szövettani otoszklerózis prevalenciája 8-11%, széles körű, nem szelektált kórbonctani leletek alapján (3). Mindemellett a szövettanilag elemzett ankilotikus stapes minták

megközelítőleg kétharmadát képviseli otoszklerózis (4). Számos hipotézis vet fel virális, autoimmun, endokrin és genetikai faktorokat az otoszklerotikus csontremodelling zavar eredetére (1, 2, 5, 6), annak ellenére, hogy az etiopatogenezis mindmáig tisztázatlan.

Az otoszklerózis patogenezisében megannyi gén és a gének fehérje termékei játszanak potenciális szerepet, amelyek tovább bonyolítják a csontmetabolizmust és részt vesznek a gyulladásos folyamatok szabályzásában is (7, 8). Tudományos beszámolók szerint az otoszklerózis kifejlődéséhez hozzájárulhat a COL1A1/A2 (I-es típusú kollagén A1 és A2 allélje), a BMP2, BMP4 (bone morphogenetic protein 2 és 4), a TGF- β 1 (transforming growth factor- β 1), a RELN (reelin) és a renin-angiotenzin-aldoszteron-rendszer (RAAS) génjei is (9–15). Azonban ezek a genetikai összefüggések nem képesek hiánytalanul megmagyarázni néhány otoszklerózisra igen jellemző tulajdonságot, mint például a női dominanciát, a felnőttkori kezdetet, a szervspecifitást és a gyulladásos csontremodelling zavart (1, 2, 16).

Az angiotenzinogén (AGT) kaszkád aktivációjának első lépéséért a renin felelős, ami végső soron aldoszteron felszabadulást eredményez, következményes vazokonstrikcióval és hipertenzióval (17, 18). Az AGT-t az aszpartil-proteáz aktivitású renin angiotenzin-I-re hasítja, majd az angiotenzin-I konvertáló enzim (ACE) hatására tovább alakul angiotenzin-II-vé. Az ACE a vérnyomás és az elektrolit egyensúly egyik kimagaslóan fontos szabályzó mediátora (17, 18). Mivel az angiotenzin-II elősegíti a tumor nekrozis faktor- α (TNF- α), interleukin 6 (IL6), IL19 és TGF- β expressziót, így patológias összefüggések között joggal tulajdoníthatnak részleges szerepet a RAAS-nek a csontremodelling szabályzásban (19–21).

Jelen összefüggések fényében kézenfekvő azt gyanítani, hogy az RAAS szintén szerepet játszik az otoszklerózis patogenezisében. *Imauchi* felvetése szerint a RAAS aktivitása kapcsolatban áll különféle gének polimorfizmusával, beleértve az AGT M235T-t, ACE-I/D-t és AT-IR A/C(1166)-t (15). Ezen polimorfizmusokat széles körű, nem szelektált francia populációban vizsgálták, azonban csupán 6 klinikailag otoszklerotikus páciens stapedaltapát vizsgálták molekuláris biológiai módszerekkel és szövettanilag (15). Szignifikáns összefüggést állapítottak meg az otoszklerózis és az AGT M235T és az ACE-I/D allélek polimorfizmusai között (15). Ezzel ellentétben, nem találtak kapcsolatot az AT-IR A/C(1166) allél polimorfizmus és az otoszklerózis között (15). Jelen megfigyelések vetik fel a kapcsolatot a lokális RAAS aktivitás és az otoszklerózis között; mindemellett nem található újabb kiegészítő információ erről a témáról az irodalomban (15). Hipotetikusan, az ACE-gátlók (enalapril, ramipril stb.) és az AT IIIR-blokkolók (losartan, valsartan stb.) csökkenthetik az otoszklerózis kialakulásának esélyét vagy feltartóztathatják a betegség progresszióját (15, 18). *Rudic és munkatársai* otoszklerotikus sejtkultúrákon demonstrálták az AT IIIR gyorsító szerepét a gyulladásos csontremodelling betegségben (21). In vitro körülmények között az AT-II emeli az interferon- γ (IFN- γ) és az IL-10 expressziós szintjét és csökkenti a makrofág inflammatorikus protein 1- α (MIP-1 α) és a szolubilis TNF- α Receptor II expresszióját (21). Később *Schrauwen és munkatársai* ugyancsak nem találtak bizonyítékot a RAAS és az otoszklerózis közötti kapcsolat alátámasztására egy átfogó belga-holland tanulmányban (22).

Jelen tanulmány a RAAS 4 tagjának expressziós mintázatát vizsgálja szövettanilag igazolt otoszklerotikus stapedaltapokban, kortikális csontfragmentumokban és emberi veseszövetekben, azon célból, hogy tisztázhassa a RAAS tényleges szerepét az otoszklerózis patogenezisében.

Anyagok és módszerek

Betegek és kontrollok

Vizsgálataink alapját húsz különböző betegből (n=20, nő=16, férfi=4) stapedectomy során eltávolított 20 ankilotikus stapes képezte. A betegek átlagéletkora 47,35 évnek mutatkozott (24–56). Tisztahang küszöbaudiometriával a csont-lég-köz (ABG) 1000 Hz-en legalább 30 dB-nek bizonyult. Mindazonáltal a stapes műtét indikációja az érintett fül 1024 Hz-es hangvilla Rinné negativitása alapult. A preoperatív tympanometria 32 (80%) fülön As-típusú, míg 8 (20%) esetben A-típusú tympanogramot tárt fel. Az összes fülön (n=40) multifrekvenciás tympanometria készült. A stapedectomyán átesett fülek közül 17 (42,5%) esetben a rezonancia frekvencia 1100 Hz felettinek bizonyult, míg 3 (7,5%) esetben csupán a kontralaterális fülben mértünk hasonlót. Klinikailag a stapes fixáció bilaterális jelleget öltött tizenhét (90%) betegnél; azonban minden betegből csak egy stapes nyertünk ki és vizsgáltunk, mivel ilyen rövid időtartam alatt csak unilaterális stapedectomy végezhető el. A részlegesen eltávolított stapedaltapok nem kerültek be a vizsgálatba, ugyanis pont a léziót tartalmazó elülső vagy hátsó pólus maradhat vissza az ovális ablak fülkéjében. A töredezett és teljesen rekonstruált tapok nem lettek kizárva. Laterális atticotomia során a csontos hallójáratból tíz (n=10) esetben kortikális csontfragmentumot távolítottunk el stapes ankilózisos betegekből, amelyeket csontspecifikus (nem szövetspecifikus) kontrollnak használtunk. Tíz (n=10, nő=6, férfi=4) cadaver vese-szövetmintát alkalmaztunk a RAAS expressziójának pozitív kontrolljaként. A cadaver mintákat a halál beállta után kevesebb, mint 20 órán belül eltávolítottuk. A pozitív kontrollok átlagéletkora 52,17 évnél (46–62 év) mutatkozott. A stapedaltapok és a kontroll minták összegyűjtése 2012. január és 2012. május között zajlott (DE OEC Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika és Patológia; Bajcsy-Zsilinszky Kórház Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Osztály). Minden páciens írásos tájékoztató beleegyezését adta a tanulmányhoz. A Magyar Tudományos Kutatás Etikai Bizottsága (ETT-TUKEB/2008-113-547/89) engedélyezte a vizsgálatot. A tanulmány a Helsinki Deklaráció szerint ment végbe.

RAAS-specifikus (Renin, ACE, AT-II és AT-IIIR) immunfluoreszcens festés

A fixált stapedaltapokat (n=20), kortikális csontfragmentumokat (n=10) és a vese-szövetmintákat (n=10) 10%-os (w/v) formaldehidben fixáltuk. A stapedaltapokat és a kortikális csontokat 0,02%-os (w/v) nátrium-azide-ot (72 h, 4 °C) tartalmazó 0,5 M-os Na-EDTA oldatban dekalcináltuk. Az emberi veseminták nem lettek Na-EDTA-val kezelve. A mintákat 15%-os (w/v) analitikai tisztaságú zselatinba ágyztuk (24 h, 56 °C), majd 4%-os (w/v) paraformaldehid oldatban újrafixáltuk (24 h, 20 °C). A szövettani blokkok krioprotekciójáról 20%-os (w/v) szacharóz oldat (2 h, 4 °C) gondoskodott és –25 °C-on 10 μ m vastagságú szeleteket metszettünk (MNT-200, Slee, Mainz, Németország) belőlük. A szeleteket 0,1 M-os PBS (foszfát-pufferolt saline) és 0,03%-os (w/v) nátrium-azide oldatban 4 °C-os hőmérsékleten tároltuk. 5 egymást követő 10 μ m vastagságú fagyasztott metszetet a következőként vizsgáltunk:

- Hematoxilin-eozin festés (HE),
- renin-specifikus immunfluoreszcens vizsgálat (IFA),
- AT-II-specifikus IFA,
- ACE-specifikus IFA,
- AT-IIIR-specifikus IFA.

Az első metszeteket minden egyes blokkból hagyományos HE festéssel dolgoztuk fel. A további sorozatokat minden egyes mintából átmottuk, és a fehérjéket számár normál szérumot (SC-2044, Santa Cruz, CA, USA) tartalmazó 0,2M-os PBS oldattal blokkoltuk. A második metszeteket 1:200 poliklonális nyúl anti-

humán renin primer antitest oldattal (20 °C, 48 h, folyamatos rázás) (SC-22752, Santa Cruz, CA, USA) inkubáltuk. A primer antitesteket 0,2 M-os PBS-sel mostuk ki és 1:300 másodlagos Texas Red-jelölt IgG oldattal (20 °C, 12 h, folyamatos rázás) (Santa Cruz) inkubáltuk. A harmadik metszeteket 1:200 monoklonális egér anti-humán angiotenzin-II primer antitest oldattal (20 °C, 48 h, folyamatos rázás) (SC-37451 I, Santa Cruz) inkubáltuk. A primer antitesteket 0,2 M-os PBS-sel mostuk ki és 1:300 másodlagos Texas Red-jelölt IgG oldattal (20 °C, 12 h, folyamatos rázás) (Santa Cruz) inkubáltuk. A negyedik metszeteket 1:200 poliklonális kecske antihumán angiotenzin-II receptor primer antitest oldattal (20 °C, 48 h, folyamatos rázás) (SC-7421 I, Santa Cruz) inkubáltuk. A primer antitesteket 0,2 M-os PBS-sel mostuk ki és 1:300 másodlagos FITC-jelölt IgG oldattal (20 °C, 12 h, folyamatos rázás) (Santa Cruz) inkubáltuk. Az ötödik metszeteket 1:200 monoklonális egér antihumán ACE primer antitest oldattal (20 °C, 48 h, folyamatos rázás) (SC-73668, Santa Cruz) inkubáltuk. A primer antitesteket 0,2 M-os PBS-sel mostuk ki és 1:300 másodlagos FITC-jelölt IgG oldattal (20 °C, 12 h, folyamatos rázás) (Santa Cruz) inkubáltuk. A metszeteket UV transzparens médiummal fedtük (Vectashield™, Vector Laboratories, CA, USA). A képfeldolgozást 486 nm-es és 510 nm-es hullámhosszokon, 69 ms-os expozíciós idővel UV fény alatt végeztük, és a fényképeket tif formátumban archiváltuk (Axioskop2 MOT™, Axiovision 3.0™, Zeiss, Jena, Németország). Az RAAS-specifikus immunreakciók megbízhatóságát már teszteltük és alátámasztottuk korábbi tanulmányunkban a TNF- α receptor I és II specifikus IFA vizsgálatunkban (23). A szövettani vizsgálatokat két különböző kutató elemezte: C. P. a HE festéssel készült, míg K. T. az immunfluoreszcens módon előállított metszeteket értelmezte. Az otoszklerózis szövettani aktivitásának vizsgálata a H. E. metszetek alapján a cellularitáson és a cementvonalak szerkezetén alapult (16). Minthogy az otoszklerózis multifokális betegség a stapediális lézió hisztopatológiai aktivitása nem felel meg teljes mértékben az otoszklerózis klinikai aktivitásának (1, 16). Az aktív otoszklerózist széles pszeudovaskuláris terek jellemzik, amelyeket emelkedett számú, alakatlan és sokmagvú oszteoklaszt tölt ki. A cementvonalak fonott mintázatot mutatnak. Az inaktív otoszklerózis eltömődött vaszkuláris terekkel és reszorpciós lakúnákkal definiálható, amelyek csökkent számú oszteoklasztot (üres halosejtek) tartalmaznak. Az oszteoid szerkezet általában lemezes mintázatba rendeződik. Az I-es táblázat a RAAS tagjaival alkotott pozitív immunfluoreszcens reakciók ismertetőjeleit reprezentálja a különféle szövetmintákban.

Eredmények

RAAS-specifikus immunfluoreszcens vizsgálattal analizáltunk egyenként ankilózis stapestalpokat (n=20), kortikális csont fragmentumokat (n=10) és humán veseszöveteket (n=10).

Az összes ankilotikus stapestalp otoszklerózisnak bizonyult szövettani vizsgálatok megerősítése alapján (1. ábra, 1. táblázat). Jelen betegcsoportból 13 páciens otoszklerotikus fókusza aktív, míg 7 inaktív mutatkozott (1. ábra, 1. táblázat). Az analízisen átesett stapestalpokat csak egy otoszklerotikus góc érintette. Az otoszklerotikus fókuszok elhelyezkedése a 20 stapestalp tekintetében különbözött. Leggyakrabban az elülső pólusban (n=16) jelentek meg, azonban lokalizálhatóak voltak bipolárisan (n=3) és a stapesfülkét obliteráló (n=1) módon is. A RAAS-specifikus immunreakciók belső kontrolljaként az összes stapestalp pozitív immunreakciót mutatott TNF- α receptor I-re, ami teljességgel függetlennek bizonyult az otoszklerózis szövettani aktivitásától (2. ábra, 1. táblázat). TNF- α receptor II expresszió I I aktív otoszklerotikus fókuszt tartalmazó mintában volt detektálható (2. ábra, 1. táblázat).

Korábbi megfigyelésekkel egyetemben, pozitív kontrollként emberi vese szövetmintákat alkalmaztunk erőteljes citoplazmatikus RAAS expressziójuk miatt (3. ábra, 1. táblázat). A glomerulusok epitheliális sejtjei, a proximális és disztális kanalikulusok és a juxtaglomeruláris apparátus (JGA) módosult neuroendokrin sejtjei is meglehetősen intenzív immunreakcióban pompáztak, ezzel is körvonalazva az egyes nefron egységek komplex struktúráját (3. ábra, 1. táblázat). Tíz nagy nagyítású mikroszkópos mező (400x) átlagában a renin-, AT-II-, ACE-, és AT IIR-t expresszáló sejtek száma egyenként 284,7-, 193,3-, 311,2- és 201,8-nak bizonyult (1. táblázat).

A csontspecifikus kontrollként használt kortikális csontfragmentumok tetemes mennyiségű RAAS-specifikus immunreakciót adtak (3. ábra, 1. táblázat). A perivaszkuláris régióban csontvelői progenitor sejtek gyenge gyűrűszerű és helyenként homogén immunreaktivitást produkáltak az RAAS négy tanulmányozott tagja ellen (3. ábra, 1. táblázat) (24). Tíz nagy nagyítású mikroszkópos mező (400x) átlagában a renin-, AT-II-, ACE-, és AT IIR-t expresszáló sejtek száma egyenként 18,9-, 15,6-, 24,8- és 27,1-nek mutatkozott (1. táblázat). Szöges ellentétben a korábbiakkal, az oszteoid állományba ágyazott egyszerű oszteociták RAAS-specifikus immunreakciója hiányzott (2. ábra).

Az aktív vagy inaktív otoszklerotikus gócot ábrázoló stapestalp negatív immunreakcióval jellemezhetőek reninre, AT-II-re, ACE-

I. táblázat: Otoszklerotikus stapes talpakban, csont-specifikus és pozitív kontroll mintákban a renin-angiotenzin-aldoszteron-rendszer fehérje tagjainak és a TNF- α receptorok (I és II) immunreakciója.

Minták (n=40)	Renin ¹	AT-II ²	ACE ³	AT-IIR ⁴	TNFR-I ⁵	TNFR-II ⁶
Otoszklerotikus stapes (n=20)						
Aktív otoszklerózis (n=13)	– (0)	– (0)	– (0)	– (0)	+++ (58,7)	++ (49,8)
Inaktív otoszklerózis (n=7)	– (0)	– (0)	– (0)	– (0)	+++ (23,5)	–/+ (2,1)
Kortikális csont (n=10)	++ (18,9)	++ (15,6)	++ (24,8)	++ (27,1)	n.a. ⁷	n.a.
Humán vese minták (n=10)	++++ (284,7)	+++ (193,3)	+++ (311,2)	+++ (201,8)	n.a.	n.a.

¹ Az immunfluoreszcens próbák intenzitása (IFA): + gyenge gyűrűszerű immunreaktivitás; ++ gyenge homogén immunreaktivitás; +++ erős homogén vagy gyenge szemcsézett immunreaktivitás; ++++ erős konfluáló és masszív szemcsézett reakció; – negatív reakció. A számok az immunreaktív sejtek mennyiségét jelzik 10 nagy nagyítású mező (400x) átlagában.

² AT-II: Angiotenzin-II

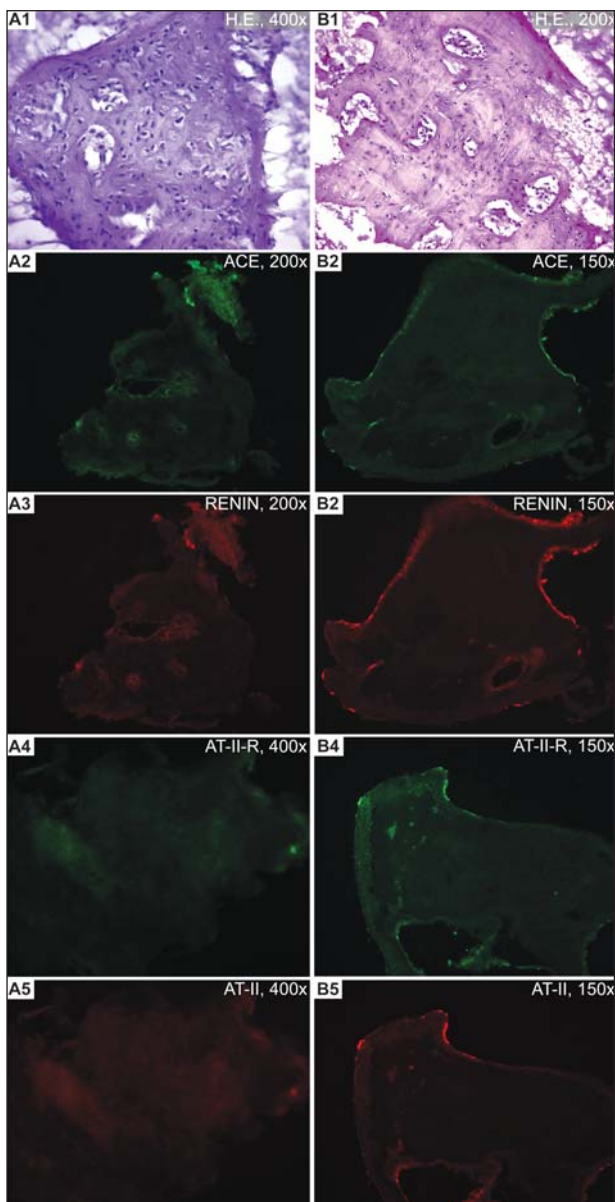
³ ACE: Angiotenzin konvertáló enzim

⁴ AT-IIR: Angiotenzin-II receptor

⁵ TNFR-I: Tumor nekrosis faktor- α I-es típusú receptor

⁶ TNFR-II: Tumor nekrosis faktor- α II-es típusú receptor

⁷ n. a.: Nem áll rendelkezésre



re és AT IIR-ra nézve (1. ábra, 1. táblázat). Az AT IIR-t kizárólag a vestibuláris felszín hyalinporc rétegének maradék kondrocitái expresszálták (1. ábra). Mindenképpen említést érdemel, hogy az UV-átvilágítás expozíciós idejét 134 msec-ra kellett növelnünk, hogy ezt az elhanyagolhatónak tűnő expressziót detektálhassuk. Azonban az expozíciós idő növelése a fehérje expresszióban nem eredményezett jobb kimutathatóságot. A léziót képző sejtek, mint például az oszteoblasztok, a fibroblasztok és a sokmagvú oszteoklasztok, nem okoztak immunreakciót az RAAS vizsgált tagjaiban (1. ábra). A hiányzó fehérje expresszió függetlennek bizonyult a szövettani diagnózistól és az otoszklerózis szövettani aktivitásától is (1. ábra, 1. táblázat). Mivel az otoszklerotikus stapestalp alapvetően negatív RAAS-specifikus fehérje expresszióval jellemezhetőek, így eltekintettünk az RAAS-specifikus mRNS-ek RT-PCR vizsgálatától.

Megbeszélés

Jelen tanulmányunk céljából tűztük ki, hogy szövettanilag igazolt otoszklerotikus stapestalpból morfológiai leírást biztosítsunk a RAAS tagjainak szövetspecifikus expressziójáról. Nemrég megjelent tanulmányok foglalkoztak a RAAS gének betegség-asszo-

1. ábra: A RAAS expressziójának immunfluoreszcens demonstrációja otoszklerotikus stapestalpakban

A1: A stapestalp elülső pólusában elhelyezkedő aktív otoszklerotikus góc hipocelluláris oszteoiddal és számos oszteolitikus lakúnával (HE, jobb fül).

A2: Az angiotenzin konvertáló enzim (ACE) negatív immunfluoreszcens reakciója.

A3: Az előző metszet renin-specifikus immunfluoreszcens próbája. Az otoszklerotikus fókuszban immunreakció nem figyelhető meg.

A4: Az angiotenzin-II receptor (AT IIR) immunreakciója szintén negatívnak bizonyult.

A5: Az angiotenzin-II-specifikus immunreakció is negatív eredménnyel zárult.

B1: A stapestalp elülső pólusában kialakult inaktív otoszklerotikus fókusz (HE, jobb fül). A léziót komoly hipocellularitás, üres halósejtek és tág pszeudovaskuláris oszteolitikus lakúnák jellemzik.

B2: Az ACE-specifikus próba negatív immunfluoreszcens reakciót mutat.

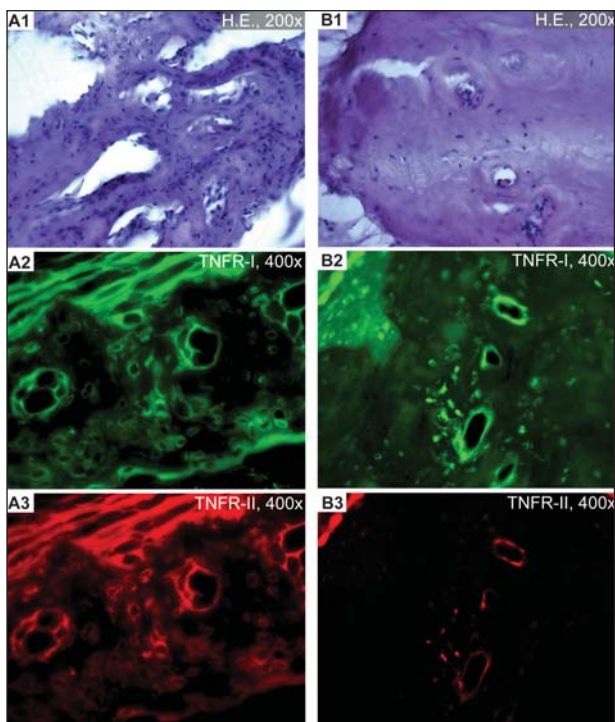
B3: Az előző metszet renin-specifikus immunfluoreszcens festése, ami szinte teljes mértékben reakciómentes.

B4: Az AT IIR immunfestése szintén reakciómentes.

B5: Az AT II-specifikus immunreakció negatív eredményt mutat.

ciált SNP-i és az otoszklerózis lehetséges genetikai összefüggéseivel, klinikailag otoszklerózisnak diagnosztizált betegekben (15, 21). Schrauwen és munkatársaival egyetértésben mi sem tudtuk alátámasztani a korábban felvetett kapcsolatot a RAAS és az otoszklerózis között, mivel képtelenek voltunk RAAS-specifikus fehérje expresszió detektálására otoszklerotikus stapestalpakban (22). Mindazonáltal, jelen észrevételeink nem meglepőek, hiszen a RAAS expresszióról eddig kizárólag parenchimaszervekben (agy, tüdő, hasnyálmirigy, arteriális adventitis réteg, neurális, vaskuláris és veseszövetekben) számoltak be (17, 18). Ezzel szemben szignifikáns renin, ACE, AT-II és AT IIR expressziót találtunk a csontspecifikus kontrollként alkalmazott kortikális csontfragmentumok perivaskuláris oszteoid progenitor-sejtjeiben (24). Jelen megfigyelések alátámaszthatják a már korábban jelentett csontvelő-asszociált RAAS szerepét a lokális csontforralom szabályzásában (19, 20, 21). A kortikális csontok és a stapestalp RAAS expressziós mintázata körüli ellentmondások a humán otikus kapszula különböző embrionális eredetével és az egyedülálló metabolikus tulajdonságaival magyarázható (1, 2, 16). Másrészt, az aldosteron – az RAA jelátviteli út vonal egyik végterméke – is hatással lehet az otoszklerózis patogenezisére a feszültségfüggő kalciumcsatornák káliumfüggő szabályozása által (19, 20, 21). Az utóbbi hipotézis további vizsgálatokat szükségeltet a jövőben.

Grayeli és kutatócsoportja a RAAS génjeinek számos SNP-jéről tudósított az otoszklerózis patogenezisével kapcsolatban (15). Azonban a mi tanulmányunkhoz képest nem hagyható figyelmen kívül az a különbség, miszerint az otoszklerózis diagnózisa a sebészileg eltávolított stapestalp szövettani analízise nélkül történt (15, 21). Elképzelhető, hogy mindez a sebészeti technika korlátaival magyarázható, ugyanis a stapedotomia és a parciális stapedectomy nem alkalmas módszerek a stapestalp fragmentumok kinyerésére és a fixációt okozó lézió feldolgozására. Továbbá a genetikai kapcsolaton alapuló beszámolók a kivont fehérvsejtek teljes DNS állományából történtek, ami nem felel meg a valós humán stapestalpban előforduló, helyi RAAS



2. ábra: A TNFR-I/II immunfluoreszcens megjelenése otoszklerózisban

A1: Az otoszklerózis aktív stádiuma (HE).

A2: A léziót alkotó sejtek erőteljes annuláris TNFR-I-specifikus immunreakciója.

A3: A TNFR-II meglehetősen hasonló mintázatú reakciója.

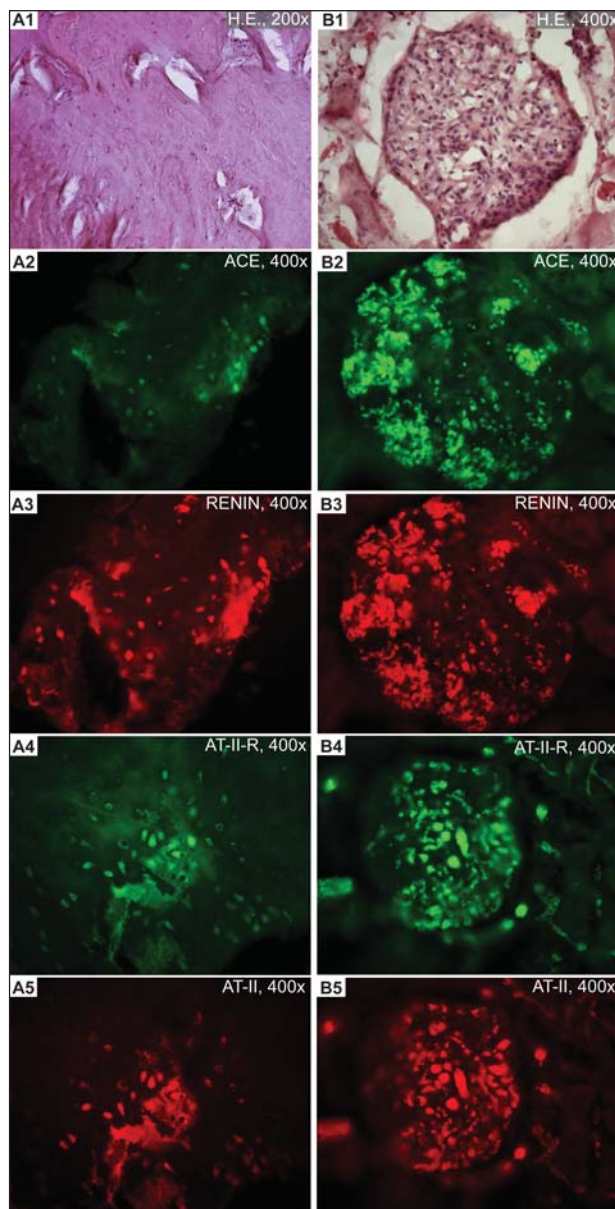
B1: Inaktív otoszklerotikus fókus (HE).

B2: Az előző metszet gyenge annuláris TNFR-I-specifikus immunreakciója ábrázolódik.

B3: A TNFR-II immunfestése gyakorlatilag negatív.

expressziós mintázatnak. Fontosnak tartottuk a RAAS-asszociált fehérjék expressziójának vizsgálatát az emberi stapedalpakban, mivel ezen eredmények nélkül a genetikai kapcsolat pusztán statisztikai jellegű észrevétel is lehet (15).

Imauchi és munkatársai statisztikailag szignifikáns kapcsolatról számoltak be az első közleményükben a klinikai otoszklerózis (n=186) és az AGT M235T és ACE I/D polimorfizmusok között (15). Továbbá az ACE TT és DD genotípus magasabb arányban jelent meg a stapes fixációs esetekben, mint a kontrollcsoportban (15). Később *Schrauwen és munkatársai* vetették fel a fals-pozitív eredményekkel kapcsolatos aggodalmaikat, miszerint a korábbi asszociáción alapuló tanulmányok további reprodukciója szükséges szélesebb beteganyagban (22). A szerzők szerint a kis esetszámú, úgynevezett replikációs tanulmányok alacsony validitásának hibája pont a replikáció maga (22). Így a kezdetben vizsgálatnál jóval nagyobb esetszámú populációt tanulmányoztak (n=692), és a validitás számításuk (power calculations) 97 és 100%-os teljesítményt mutatott a korábban talált ACE I/D és AGT M235T hatásainak kimutatási biztonságában (22). Ilyen validitási értékek mellett nem találtak szignifikáns asszociációt az otoszklerózis és a fenti SNP-k jelenléte között (22). Összegzőképpen, *Schrauwen* meglátása alapján a RAAS és az otoszklerózis között korábban vélelmezett összefüggéseket fals-pozitív eredménynek értékeli, ami meggyőzően nem ismételhető meg (22). Az is megállapítható, hogy *Schrauwen és munkatársai* szintén az eltávolított stapedalpak szövettani vizsgálata nélkül extrapolálták eredményeiket otoszklerózisra (15, 22). Miután a stapes fixációk



3. ábra: A RAAS immunfluoreszcens bemutatása csontspecifikus kontrollokban és humán vesemintákban
A1: A kortikális csont normál struktúrájú cementvonalakait és ereket ábrázol (HE, jobb fül).

A2: Angiotenzin konvertáló enzim (ACE) gyenge pozitív immunreakciót mutat a perivaszkuláris oszteoid progenitor sejtekben.

A3: A korábbi metszet renin-specifikus immunreakciója meglehetősen hasonló mintázattal.

A4: Az angiotenzin-II receptor (AT IIR) immunfestése pozitív reakcióval.

A5: Angiotenzin-II (AT II) szintén pozitív reakciót ábrázol.

B1: Emberi vesekéregben elhelyezkedő glomerulus szövettani reprezentációja (HE).

B2: Az ACE pozitív immunfluoreszcens reakcióval jár.

B3: A korábbi metszet renin-specifikus immunfluoreszcens próbája. Az epitheliális sejtek erőteljes renin expressziót reprezentálnak.

B4: Az AT IIR szintén pozitív reakciót mutat.

B5: AT II-specifikus pozitív immunreakció.

közel egyharmada nem otoszklerotikus stapes fixáció, így a betegek számának emelése növelheti az otoszklerózis diagnózisára vonatkozó genetikai asszociációs tanulmányok statisztikai erejét (4, 22). Jelen tanulmányunkban mi nem szándékoztunk gyarapítani a korábban megjelent asszociációs vizsgálatok számát validitás számításával. Célunk a betegség által érintett stapestalpak fehérje expressziójának összehasonlítása volt, pozitív kontrollként alkalmazott vesemintákkal.

Imauchi és munkatársai is tárgyalták már az első tanulmányukban, hogy az AT-II növeli az IL-6 in vitro szekrécióját és csökkenti alkalín-foszfátáz aktivitást a klinikailag stapes fixációban szenvedő páciensekből létrehozott szövetkultúrákban (15). Mivel az aktív otoszklerózis alapvetően emelkedett alkalín-foszfátáz aktivitással jellemezhető, így ezek az eredmények ellentmondásosnak tűnnek (1, 25). Nemrég *Rudic és munkatársai* jelentették, hogy klinikailag otoszklerotikus szövettenyészetekben az AT-II megnövekedett IFN- γ , IL-10, MIP 1- α és szolubilis TNF- α R-II expresszió keresztül elősegíti a gyulladást (21). Ezek a vizsgálatok akárhogy is, de ellentétesek az otoszklerózis patogenezisével kapcsolatban szerzett korábbi tapasztalatokkal (1, 7). Az otoszklerózis patofiziológiájára vonatkozó, jelenleg érvényben lévő konszenzusnak köszönhetően a betegség aktív stádiuma megnövekedett oszteoblaszt aktivitással és aberráns új csontképződéssel jellemezhető, emellett emelkedett alkalín-foszfátáz aktivitás, TNF- α és TNF- α receptor expresszió detektálható (1, 7, 23). A betegség inaktív stádiumának meghatározó fehérjeje az oszteoprotegerin, amely teljesen független a RAAS funkcióitól (19, 20, 25). Úgy gondoljuk, hogy a számos egymással kölcsönösen összefüggő faktor kapcsolatban áll a humán otikus kapszula speciális tulajdonságaival, ami magyarázatul szolgálhat a RAAS tagjainak expressziójáról létrejött inkongruens megállapításokra az emberi stapestalpakban (1, 2, 5, 7). Mindazonáltal szubjektíven tekintve a korábbi tanulmányokra, egy kérdés megfogalmazódik: Mi lehet a szerepe a fehérje koordinált vazokonstrikciónak, vérnyomásnak és renális filtrációnak az otoszklerotikus csontremodelling zavar patogenezisében? Bizonyára a mi megfigyeléseink is további vizsgálatokat igényelnek a jövőben. Az otoszklerózis kezelésében alkalmazható ACE-inhibitorok és az AT-receptor blokkolók használata további in vitro analízist szükségeltet szövettenyészeti otoszklerotikus szövettenyészeten. Továbbá audiológiai és radiológiai (HRCT) módszerekkel követett prospektív tanulmányok nélkülözhetetlenek, amelyekben klinikai otoszklerózisban és mellékesen magasvérnyomás-betegségben is szenvedő pácienseket ACE-gátlókkal vagy AT-receptor blokkolókkal kezelünk, így szolgálva érdekes adatokat ezen gyógyszercsoportok terápiás hatékonyságáról.

Következtetés

Összegzőképpen megállapítható, hogy a RAAS tagjainak expressziója nem igazolható otoszklerotikus stapestalpakban. Jelen megfigyeléseink megkérdőjelezzik az összefüggéseket a RAAS expressziója és az otoszklerózis patogenezise között. Eredményeink fényében úgy gondoljuk, hogy további tanulmányok szükségesek, hogy meghatározhassuk az RAAS tényleges szerepét az otoszklerózis patofiziológiájában.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozunk Dr. Lektor Bálintnak (Bajcsy-Zsilinszky Kórház, Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Osztály, Budapest, Magyarország) és Prof. Dr. Molnár Péternek (DE OEC, Patológiai Intézet, Debrecen, Magyarország) az ankylotikus stapes és a cadaver veseminták összegyűjtéséért. Tanulmányunk az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok támogatásával jött létre (OTKA K81480). Jelen közlemény másodközlés (Otol Neurotol 2013; 34 (5): 808–815.), amelyet a Wolters Kluwer Kiadó engedélyezett.

Irodalom

1. Chole RA, McKenna M. Pathophysiology of otosclerosis. Otol Neurotol 2001; 22 (2): 249–257.
2. Karosi T, Szekanez Z, Szilkei I. Otosclerosis: an autoimmune disease? Autoimmun Rev 2009; 9 (2): 95–101.
3. Declau F, Van Spaendonck M, Timmermans JP, et al. Prevalence of otosclerosis in an unselected series of temporal bones. Otol Neurotol 2001; 22 (5): 596–602.
4. Karosi T, Csomor P, Petkó M, et al. Histopathology of nonotosclerotic stapes fixations. Otol Neurotol 2009; 30 (8): 1058–1066.
5. Schrauwen I, Van Camp G. The etiology of otosclerosis: a combination of genes and environment. Laryngoscope 2010; 120 (6): 1195–1202.
6. McKenna MJ, Mills BG, Galey FR, et al. Filamentous structures morphologically similar to viral nucleocapsids in otosclerotic lesions in two patients. Am J Otol 1986; 7 (1): 25–28.
7. Stankovic KM, McKenna MJ. Current research in otosclerosis. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg 2006; 14 (5): 347–351.
8. Van Den Bogaert K, Govaerts PJ, De Leenheer EM, et al. Otosclerosis: a genetically heterogeneous disease involving at least three different genes. Bone 2002; 30 (4): 624–630.
9. Chen W, Meyer NC, McKenna MJ, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the COL1A1 regulatory regions are associated with otosclerosis. Clin Genet 2007; 71 (5): 406–414.
10. Lehenrdt G, Metz KA, Trellakis S, et al. Signaling by way of type IB and II bone morphogenetic protein receptors regulates bone formation in otospongiosis. Laryngoscope 2007; 117 (5): 812–816.
11. Lehenrdt G, Unkel C, Metz KA, et al. Immunohistochemical evidence of BMP-2, -4 and -7 activity in otospongiosis. Acta Otolaryngol 2008; 128 (1): 13–17.
12. Thys M, Schrauwen I, Vanderstraeten K, et al. The coding polymorphism T2631 in TGF-beta 1 is associated with otosclerosis in two independent populations. Hum Mol Genet 2007; 16 (17): 2021–2030.
13. Schrauwen I, Ealy M, Huentelman MJ, et al. A genome-wide analysis identifies genetic variants in RELN gene associated with otosclerosis. Am J Hum Genet 2009; 84 (3): 328–338.
14. Schrauwen I, Ealy M, Fransen E, et al. Genetic variants in RELN gene are associated with otosclerosis in multiple European populations. Hum Genet 2010; 127 (2): 155–162.
15. Imauchi Y, Jeunemaitre X, Boussion M, et al. Relation between renin-angiotensin-aldosterone system and otosclerosis: a genetic association and in vitro study. Otol Neurotol 2008; 29 (3): 295–301.
16. Parahy C, Linthicum FH Jr. Otosclerosis and otospongiosis: clinical and histological comparisons. Laryngoscope 1984; 94 (4): 508–512.
17. Nguyen Dinh Cat A, Touyz RM. A new look at the renin-angiotensin system focusing on the vascular system. Peptides 2011; 32 (10): 2141–2150.
18. Baudin B. New aspects on angiotensin-converting enzyme: from gene to disease. Clin Chem Lab Med 2002; 40 (3): 256–265.
19. Gelinas L, Falkenhay A, Oxner A, et al. Highly purified human peripheral blood monocytes produce IL-6 but not TNF-alpha in response to angiotensin II. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst 2011; 12 (3): 295–303.
20. Ma F, Li Y, Jia L, et al. Macrophage-stimulated cardiac fibroblast production of IL-6 is essential for TGF-beta/Smad activation and cardiac fibrosis induced by Angiotensin II. PLoS One 2012; 7 (5): e35144.
21. Rudic M, Nguyen C, Nguyen Y, et al. Effect of angiotensin II on inflammation pathways in human primary bone cell cultures in otosclerosis. Audiol Neurotol 2012; 17 (3): 169–178.
22. Schrauwen I, Thys M, Vanderstraeten K, et al. No evidence for association between the renin-angiotensin-aldosterone system and otosclerosis in a large Belgian-Dutch population. Otol Neurotol 2009; 30 (8): 1079–1083.
23. Csomor P, Szilkei I, Karosi T. TNF-alpha receptor expression correlates with histologic activity of otosclerosis. Otol Neurotol 2009; 30 (8): 1131–1137.
24. Maes C, Kobayashi T, Selig MK, et al. Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. Dev Cell 2010; 19 (2): 329–344.
25. Karosi T, Csomor P, Szalmás A, et al. Osteoprotegerin expression and sensitivity in otosclerosis with different histological activity. Eur Arch Otorhinolaryngol 2011; 268 (3): 357–365.